

(54) NOVEL LYSOZYME-SENSITIVE MICROORGANISM

- (11) 58-56678 (A) (43) 4.4.1983 (19) JP
 (21) Appl. No. 56-151464 (22) 25.9.1981
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO K.K. (72) RIYOUICHI KATSUMATA(2)
 (51) Int. Cl. C12N1/20, C12N15/00//C12P19/34(C12N1/20, C12R1/13)(C12N1/20, C12R1/15)(C12N15/00, C12R1/13)(C12N15/00, C12R1/15)

PURPOSE: To obtain protoplast of bacterium, without pretreatment with an agent such as antibiotic, etc. during culturing, only by treating lysozyme-sensitive bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus with lysozyme.

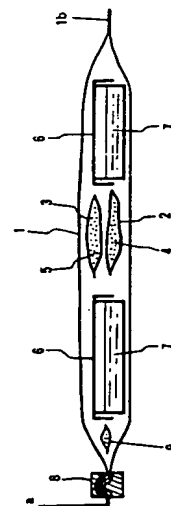
CONSTITUTION: A lysozyme-insensitive strain belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus is subjected to the mutagenic treatment, and a strain which cannot be grown in a medium containing lysozyme at an extremely low concentration (<about 25 μ g/ml) to allow the complete growth of the parent strain and nevertheless can be grown in a lysozyme-free medium. The objective lysozyme-sensitive bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus [e.g. *Corynebacterium glutamicum*, L-15 (FERM-P No.5946), *Corynebacterium herculis* L-103 (FERM-P No.5947), *brevibacterium devaricatum* L-204 (FERM-P No.5948), *Brevibacterium lactofermentum* L-312 (FERM-P No.5949), etc.] can be obtained by this process.

(54) METHOD FOR CULTURING ANAEROBIC BACTERIA AND AGENT FOR CONTROLLING CULTIVATION ATMOSPHERE

- (11) 58-56679 (A) (43) 4.4.1983 (19) JP
 (21) Appl. No. 56-153830 (22) 30.9.1981
 (71) MEITO K.K. (72) MAKOTO KASUGAI
 (51) Int. Cl. C12N1/20, C12Q1/04//C01B31/20, C12R1/01, C12R1/145, C12R1/225

PURPOSE: To carry out the cultivation of anaerobic bacterial including *Fusobacterium nucleatum* in an atmosphere containing ≤ 0.1 vol% oxygen and 10 ± 2 vol% CO₂ gas.

CONSTITUTION: A laboratory dish 6 containing a cultivation medium 7 inoculated with a specimen is put into an outer packaging bag 1. Separately, permeable inner bags 2, 3 containing a disoxidation and CO₂ generating agent 4, 5 (a combination of ascorbic acid or its salt, an alkali carbonate and/or an alkali bicarbonate, and a reaction accelerator, etc.) are put into the outer bag 1. An indicator 9 for detecting the disoxidation state is also put into the outer bag 1, and the open end 1a of the bag is closed with a clip 8. The atmosphere in the bag can be maintained at an oxygen concentration of ≤ 0.1 vol% and a CO₂ concentration of 10 ± 2 vol% by this process.

**(54) CULTIVATION OF PHOTOHYDROGEN-PRODUCING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISM**

- (11) 58-56680 (A) (43) 4.4.1983 (19) JP
 (21) Appl. No. 56-155737 (22) 30.9.1981
 (71) KOGYO GIJUTSUIN (JAPAN) (72) ATSUSHI MIYAKE(2)
 (51) Int. Cl. C12N1/20//C12P3/00(C12N1/20, C12R1/01)

PURPOSE: To carry out the photoproduction of hydrogen with hydrogen-producing photosynthetic microorganisms, for a long period, by adding a nitrogen source in the nighttime to the cultivation system of the microorganisms.

CONSTITUTION: In the photoproduction of hydrogen by the cultivation of photosynthetic bacteria having hydrogen-producing capability, e.g. *Rhodospirillum rubrum* ATCC11770, etc., a nitrogen source such as ammonium sulfate, nitrogen gas, yeast extract, etc. is added to the cultivation system in the nighttime, especially at the beginning of the nighttime.

⑬ 日本国特許庁 (JP)
⑭ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58—56678

⑥ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和58年(1983)4月4日
C 12 N 1/20		7235—4B	
15/00		7235—4B	発明の数 3
// C 12 P 19/34		7258—4B	審査請求 未請求
(C 12 N 1/20			
C 12 R 1/13)			
(C 12 N 1/20			
C 12 R 1/15)			
(C 12 N 15/00			
C 12 R 1/13)			
(C 12 N 15/00			
C 12 R 1/15)			

(全 12 頁)

⑭ 新規リゾチーム感受性微生物

① 特 願 昭56—151464
② 出 願 昭56(1981)9月25日
③ 発 明 者 勝亦暁一

町田市成瀬2—12—3 ポプラケ

丘コープ6—401
④ 出 願 人 協和醸酵工業株式会社
東京都千代田区大手町1丁目6
番1号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

新規リゾチーム感受性微生物

2. 特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、25MB/μl未満の濃度のリゾチームに感受性を示す新規リゾチーム感受性微生物。
- (2) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミナム、コリネバクテリウム・ハーキユリス、プレビバクテリウム・ダイバリカツムおよびプレビバクテリウム・ラクトファーマンタムから選ばれる微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の微生物。
- (3) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミナムL—13、コリネバクテリウム・ハーキユリスL—103、プレビバクテリウム・ダイバリカツムL—204およびプレビバクテリウム・ラクトファーマンタムL—3/2から

選ばれる微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の微生物。

- (4) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、25MB/μl未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、該微生物のプロトプラストを生成せしめることを特徴とするコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物のプロトプラストの調製法。
- (5) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、25MB/μl未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、得られるプロトプラストにデオキシリボ核酸を取り込ませ、ついで該プロトプラストを再生させることを特徴とするコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物の形質転換法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規リゾチーム感受性微生物ならびに該微生物を用いるプロトプラストの調製法お

および微生物の形質転換法に関する。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は新規リゾチーム感受性微生物ならびに該微生物を用いるプロトプラストの調製法および微生物の形質転換法を提供する。

本発明の新規リゾチーム感受性微生物には、コリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属し、 10^{-8} M 未満の濃度のリゾチームに感受性を示す微生物があげられる。本発明の微生物は、培養中に抗生物質などの薬剤前処理を施さずに、単にリゾチーム処理でその細胞壁を溶解除去され、高張条件下でプロトプラスト化される。

試験管内でデオキシリボ核酸(DNA)をベクタープラスミドDNAに組み込ませ、それを微生物細胞内に導入する遺伝子工学的技法は、最近非常に注目されている。

遺伝子工学的技法によつて得られる形質転換細胞は、ベクターの自発的複製に随伴して得られる異種DNAの製造手段としても、有用な異種

DNAの製造手段としても、また異種DNAを細胞内に存在させることによつて細胞に価値ある特性を付与する手段としても重要である。

この分野での研究の多くは大腸菌を宿主とする系で行われているが、大腸菌以外の工業的に有用な微生物、例えばアミラーゼなどの生産菌である枯草菌、抗生物質などの生産菌である放線菌および醸造用アルコールの生産菌である酵母などでも「組換えDNA技法」を確立しようとの試みがなされている。

遺伝子工学的技法では、ベクタープラスミドを単純したり、異種DNAを組み込んだハイブリッドプラスミドを解析するのに、培養細胞からのプラスミドの分離操作が必要であるが、それには、まず細胞を破壊しなければならない。その破壊はDNAのせん断を防止するために温和な条件で行う必要があるので、超音波やフレンチプレス等の機械的破壊法は適用できず、通常、細胞壁溶解酵素を用いる方法で行われている。前記の組換えDNA研究のなされている菌種に

はいずれも目的にかなう溶解酵素があり、それらが使用されている。

大腸菌や枯草菌など多くの細胞では、細胞壁溶解剤リゾチームにより容易に細胞壁を溶解除去できるが、リゾチームで溶解されない細胞もある。このような細胞壁溶解性の菌種では培養中に高濃度のグリシンなどのアミノ酸やペニシリンのような抗生物質に接触させて細胞をリゾチーム感受性化させ、しかる後にリゾチーム処理する方法がとられている。

グルタミン酸、リジン等多くのアミノ酸の工業生産に用いられるコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属に属する菌種は、通常細胞壁がリゾチームに溶解性であるので、従来、これらの菌種では培養中にペニシリンのような抗生物質を作用させた培養細胞にリゾチーム処理する前記のごとき細胞壁除去法が使われてきた。しかしながら、この方法は煩雑であるばかりでなく、高張条件下でリゾチーム処理することによつて生成する細胞壁除去細胞(プロト

プラスト)の正常細胞への復帰能(再生能)が低いなどの欠点がある。

本発明者らはコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属菌種などの有用菌種において組換えDNA技法を確立せんがために、これらの菌種の細胞壁の除去法について検索してきた。その一法として、本出願人が特開昭54-122794号公報に開示したコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属菌種のリゾチーム感受性菌株を用いてリゾチームによる細胞壁の除去法を検討してきたが、これらの菌種はいずれもリゾチーム非感受性株と同様にペニシリン等の前処理なしにはリゾチームでその細胞壁が溶解除去されなかつた。そこでさらに検討した結果、該公報公報記載のリゾチーム感受性菌株よりさらに高度のリゾチーム感受性度を有するリゾチーム超感受性菌株はその細胞壁がペニシリン等で前処理することなくリゾチームで溶解されることを見出した。さらに本発明者らは、このような菌株を用いれば、細胞内からのプラスミド

の抽出が容易に行なえ、またリゾチーム処理で生成するプロトプラストの再生能が優れているためプロトプラストを用いるD&Aによる形質転換を効率的に行わしめることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明のリゾチーム感受性株はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属のリゾチーム非感受性株（例えば野生株）またはリゾチーム低感受性株を親株とし、これを変異誘導処理して取得される。変異誘導の方法としては、紫外線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の通常の方法が用いられる。変異誘導された変異株から本発明微生物のごときリゾチームに感受性を有する菌株（以下本発明のリゾチーム感受性株をリゾチーム超感受性株ということがめる）を選抜するには、菌株が、完全に生育する極めて低濃度のリゾチーム（約15μg/ml未満）を含有する培地で生育できなくて、リゾチーム無添加培地で生育できるものを選べばよい。

本発明の微生物の具体的例としては、コリネ

バクテリウム・グルタミナム225-106株（微工研寄託受継番号5945）を親株として誘導されたL-13株（微工研寄託受継番号5946）、コリネバクテリウム・ハーヤユリスAT00/3868を親株として誘導されたL-108株（微工研寄託受継番号5947）、プレビバクテリウム・デイバリカツムAT00/4030を親株として誘導されたL-204株（微工研寄託受継番号5948）およびプレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAT00/3655を親株として誘導されたL-313株（微工研寄託受継番号5949）があげられる。これらのリゾチーム超感受性株は微生物工芸技術研究所に寄託され上記のような微工研寄託受継番号がつけられている。さらに米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションにもAT00/31833、31834、31866、31867および31868としてそれぞれ寄託されている。

なお、コリネバクテリウム・グルタミナムと

命名した225-106株は土壌から分離した菌株で、その菌学的性状は次の通りである。菌学的性質の検討は“Manual of Microbiological Methods” by the Society of American Bacteriologist Committee on Bacteriological Technique (1957)に記載された方法で行った。

1. 細胞形態

通常27~1.0×1.0~1.0ミクロンの楕円あるいは短棒状であるが、培養条件により複数の細胞が直鎖状あるいはV字型に連鎖したような多形性を示す。グラム陽性、非運動性で胞子をつくらない。

2. 富栄養培地での生育特性

斜面培地上での増殖は円状で、表面は丸状をとり、色は黄褐色である。スラント上での生育は同じく黄褐色で不透明である。大培地上の斜面培養では最上部でよく生育し、底部ではわずかに生育する。液体培養ではわずかに生育し若干綿状に沈降する。

3. 生理的性質

- 1) 温度：最適温度は33~37℃だが、42℃でかすかに生育する。
- 2) pH：最適pH7~8だが、pH6~9でも生育可能である。
- 3) 非耐熱性。
- 4) 好気性。
- 5) セラチンを消化しない。
- 6) カゼインを分解代謝しない。
- 7) インドール非産性。
- 8) カタラーゼ陽性。
- 9) 脂肪非同化性。
- 10) グルコース、フラクトース、マンノース、マルトースから酸を生成するが、キシロース、ガラクトース、ラクトースおよびグリセロールからは酸を生成しない。
- 11) ビオチン要求性。
- 12) ビオチン量制限培地では多量のグルタミンを産生する。
- 13) 高濃度ビオチン含有培地では乳酸および

びロートグルタミン酸を産生する。

以上の結果は、J. on Appl Microbiol, 7, 279~301 (1967) に記載された細菌群と比較すると、コリネバクテリウム・グルタミカムに極めてよく一致している。それゆえ、225-106株はコリネバクテリウム・グルタミカムと判定された菌株である。

リゾチーム超感受性のコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属菌株から本発明のリゾチーム超感受性変異株を取得する方法について具体的一例を以下に説明する。菌株を栄養培地に接種し20~35℃で振盪培養する。対数増殖期半ばで培養を中止して集菌し、生理的食塩水で洗浄後、適当なpH緩衝液(pH5.5~8.0)、たとえばM/20トリス・マレート緩衝液(pH6.0)に約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mlとなるように懸濁する。この懸濁液に最終濃度200~300 μ B/mlになるようにニトロソグアニジンを加え、20~35℃で30分~1時間放置する。

適心分離により集菌し、同一緩衝液で菌体を洗浄後、生理的食塩水に懸濁し、生理的食塩水で適宜希釈して一定量を栄養増大培地たとえばB増大培地(MBに1.8%増大を含む培地)上に塗布つける。25~35℃で1~4日間培養し、生じたコロニーを栄養増大培地と、25~25 μ B/mlのリゾチームを含有する栄養増大培地とにレプリカ塗布する。

レプリカ平板を25~35℃で1~4日間培養後、栄養増大培地で生育しリゾチーム含有培地では生育しない菌をリゾチーム超感受性変異株として取得する。

上記の菌株はいずれもこうして得られたリゾチーム超感受性変異株である。

リゾチーム超感受性変異株のリゾチーム感受性は対数増殖期の約 10^8 細胞相当を倍々希釈の濃度のリゾチームを含むMB増大培地上に播下後、30℃で2日間培養後、菌の生育状態を観察することによつて測定でき

る。菌の生育が全く認められない最小のリゾチーム濃度を菌のリゾチーム感受性値(最小生育阻止濃度)として各菌株と比較した結果を算/数に示す。

本発明のリゾチーム超感受性変異株は前記の如くリゾチーム25~25 μ B/ml含有するMB増大培地上で生育できない菌株として選抜することによつて得られるが、特開昭54-122794号公報に記載されたコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属菌株のリゾチーム感受性変異株はリゾチーム200~400 μ B/ml含有するMB増大培地上で生育できない菌株を選抜して得られたものであり、両者は本質的に異つた性質を有する可能性はある。換に、それらの変異菌株の菌株に用いたリゾチーム非感受性菌株は上記のリゾチーム感受性値測定法により最小生育阻止濃度400~500 μ B/mlとは同一であるにもかかわらず、本発明の微生物のリゾチーム感受性1.6~3.2 μ B/mlは特開昭54-

122794号公報記載のリゾチーム感受性菌株のリゾチーム感受性値25~400 μ B/mlとは明らかに異つている。さらに前者ではペニシリンの前処置なくして容易に細胞壁が溶解除去されることに基づいて以下に説明する有用性を有すのに対し、後者はそれらの特性がないことから、リゾチーム超感受性菌株はリゾチーム感受性菌株とは異質の菌株であることが明らかである。

表 1 変異

菌 株	微工研 寄附受贈番号	ATCC	リゾチーム感受性値 最小生育阻止濃度 (MIC, μ B/ml)
コリネバクテリウム・グルタミカム 225-106	5945	31833	800
コリネバクテリウム・グルタミカム L-15	5946	31834	3.2
コリネバクテリウム・ヘキリス ATCC/3566	-	-	400
コリネバクテリウム・ヘキリス L-103	5947	31866	3.2
プレバクテリウム・チリガナム ATCC/4020	-	-	800
プレバクテリウム・チリガナム L-204	5948	31867	1.6
プレバクテリウム・ラクトアノノム ATCC/13635	-	-	400
プレバクテリウム・ラクトアノノム L-312	5949	31868	3.2

リゾチームで容易に細胞壁が溶解除去される本発明の微生物の有用性は、(1)細胞壁が除去されたプロトプラストの再生能が優れていることに基づき、そのプロトプラストを用いることによつてDMAによる効率的な形質転換を可能ならしめ、(2)細胞中からのプラスミドのようなDMAの抽出分離を容易にする、などの点にある。以下詳細に説明する。

(1)本発明微生物からのプロトプラストの調製および該プロトプラストを用いるDMAによる形質転換

プロトプラストの調製は単に培養増殖させた細胞を直接リゾチーム処理することによつて行われる。培地は菌が増殖できるものであればよく、例えば栄養培地NBを用いる。培地に菌を接種し、25〜37℃で恒速培養して対数期の中期あるいは後期まで培養し細胞を集菌する。次いで適当な高張培地に懸濁濃度0.3〜1.0mg/mlのリゾチームを含む液に懸濁する。高張培地として

初発の正常細胞の10⁻⁵以下にすることができ

る。このようにして調製されるプロトプラストは適当な高張培地培地上でコロニー形成能(再生能)を有する。高張培地培地としては、例えばR0GP培地(グルコース3g、カゼインハイドロライゼート3g、酵母エキス2.5g、K₂HPO₄ 3.5g、KH₂PO₄ 1.5g、MgCl₂・6H₂O 0.4g、FeSO₄・7H₂O 1.0mg、MnSO₄・4~6H₂O 3.5g、ZnSO₄・7H₂O 0.9mg、(NH₄)₆Mo₇O₂₄・4H₂O 0.04mg、ピオチン30mg、サイアミン塩酸塩2mg、コハク酸二ナトリウム1.5g、ポリビニルピロリドン(分子重100,000)30gを純水1ℓに含み、pH7.2に調整した培地)を用いることができる。R0GP培地でのプロトプラストの再生は、菌体、リゾチーム処理濃度および処理時間によつて若干異なるが、リゾチーム処理供試初発正常細胞あたり20〜70%の効率である。また再

は、例えばRBM培地(グルコース20g、(NH₄)₂SO₄ 10g、尿素3g、酵母エキス1g、KH₂PO₄ 1g、MgCl₂・6H₂O 0.4g、FeSO₄・7H₂O 1.0mg、MnSO₄・4~6H₂O 0.3mg、ZnSO₄・7H₂O 0.9mg、CuSO₄・5H₂O 0.4mg、Na₂B₄O₇・10H₂O 0.09mg、(NH₄)₆Mo₇O₂₄・4H₂O 0.04mg、ピオチン30mg、サイアミン塩酸塩1mgを純水1ℓに含み、pH7.2に調整した培地)の2倍希釈液中に0.4mg/ml、0.01M MgCl₂・6H₂Oを含み、pH7.0〜8.2に調整した培地RPMを使用することができる。30〜37℃で反応することによつて正常細胞は次第にプロトプラスト化され、その速度は光學顕微鏡で観察できる。ほとんどの細胞がプロトプラスト化されるに要する時間は菌体によつて異なるが、前記条件で0.5〜2時間である。リゾチーム作用後、この菌懸濁液中の培養条件で複製死せずに生存する正常細胞はリゾチーム処理に供試した

生コロニーの出現が認められるに要する培養日数は菌体で差があるが、創菌できるまでの大きさになるのは3〜7日である。

以上のような特性をもつ微生物から得られるプロトプラストのDMAによる形質転換は、ポリエチレングリコール(PEG)またはポリビニルアルコール(PVA)と二価金属陽イオンとを共存する高張条件下で該プロトプラストとDMAとを混合処理することによつて行われる。形質転換体は、前記のプロトプラストの再生と同様にR0GP培地のごとき高張培地培地上でプロトプラストを再生させ、正常細胞として取得される。形質転換体は供与DMAに由来する遺伝子が菌に付与する特徴的形質に基いて選択することができる。この選択は高張培地培地上で再生と同時に待つてもよく、あるいは一旦非選択的に再生させてから再生細胞を集める旨の低張培地培地上で行つてもよい。

このような方法を適用して、*ミド*のプラスミドDNAで形質転換した場合、形質転換株は再生菌あたり $10^6 \sim 10^8$ の頻度で得られる。

形質転換については後記実施例に具体例を述べる。

3) 形質転換株からのプラスミドDNAの分離

菌が増殖できる培地、例えばMB培地で培養し、集菌後、リゾチームを作用させて細胞壁を溶解させる。菌細胞からは、例えばBiochim. Biophys. Acta, 111, 457-463 (1973)に記載されたような通常用いられる方法によりプラスミドを容易に細胞分離できる。

使用するリゾチームの濃度は、対象の菌株により異なるが通常 $0.1 \sim 1.0$ mg/mlの濃度で行う。

グルタミン酸、リジン等多くのアミノ酸の工業的発酵生産に用いられるコリネバク

テリウム属およびプレバクテリウム属菌への組換えDNA技法の適用は、それらの菌種あるいはその他の微生物からアミノ酸などの有用物質の生合成あるいはその調節に因与する遺伝子をクローン化し、その遺伝情報の増幅に基づく生合成系の強化により有用物質の生産量を増大せたり、さらには動植物の遺伝子をクローン化し、その遺伝情報の発現により有用なペプチドをこれらの菌種を用いて生産させ得る可能性があり、工業上極めて有用である。本発明のリゾチーム感受性微生物は、組換えDNA技法導入の前提条件となる細胞中からのプラスミド等のDNAの抽出分離、DNAによる細胞の形質転換などを効率的に行わしめることを可能にし、それゆえコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属における組換えDNA技法の適用を容易ならしめるものである。

本発明者らは、本発明微生物がさらに組換えDNA技法における安全な宿主微生物として有用であることを見出した。

組換えDNA手法において安全なホスト(宿主)ーベクター系の確立がまず第一に要求される。安全なホストの条件としては病原性がきわめて低いこと、人体に寄生しないこと、自然環境に放出された場合速やかに死滅することなどが挙げられる。最初に組換えDNA技法に用いられた大腸菌は本来人体寄生性であり、その安全性については議論のあるところであつたが、少なくとも長年実験室で細胞培養されてきたE-12株については、その寄生性、病原性は著しく低下していることが判りB1ホストとして認定された。このE-12株を人体に投与した場合数日にわたり菌の排出がみられ回収率は約1%前後と報告されている(サイエンス209巻391~394頁1980年)。

組換えDNA技法をアミノ酸・核酸・抗生物質などの生産菌に拡大していく場合、これら

微生物の多くは土壌より分離されたもので、人体への寄生性は低いと考えられるが、なかには人体消化管内の条件に耐え増殖しないまでも、そのまま生きて回収される場合も考えられる。こうした菌株の安全性をさらに増すためには、消化管内の条件で死滅するような性質を人為的に付与することが考えられる。B2ホストでは自然環境下に放置しても死滅するよう微弱な性質を付与することが行なわれている。

本発明のリゾチーム感受性微生物について動物の消化管内での生存テストを行なつたところ、動物の消化管内で著しく死滅しやすいことを見出した。すなわち、44日系の雄マウス(体重 19.8 ± 1)一群2匹に1匹あたり約 $3 \sim 8 \times 10^5$ の下記微生物を経口投与して、腸内に残存する菌数と糞便中に排泄される菌数を、それぞれの10倍ホモジネートを適量希釈しB平板培地にまいて測定した。第2表に示す如く、本発明のリゾチーム感受性菌株は、菌株に比べ著しく死滅して排泄され腸内での生存菌数も著しく減

少していることがわかる。

第 2 表

使用微生物	回収率 (%)			
	0-2.5	2.5-4.5	4.5-6.5	6.5-8.5
コリネバクテリウム・グルタミカム 225-106	52.5	0.08	8.7×10^{-7}	$< 9 \times 10^{-10}$
L-15	4.3	$< 8.3 \times 10^{-8}$	$< 1.3 \times 10^{-9}$	$< 8.7 \times 10^{-10}$
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868	44.5	0.05	4.6×10^{-7}	$< 8.5 \times 10^{-10}$
L-103	3.4	$< 8.7 \times 10^{-8}$	$< 1 \times 10^{-9}$	$< 7.3 \times 10^{-10}$
プレバクテリウム・ダイバリカツム ATCC 14021	57.3	0.09	8.4×10^{-7}	$< 8.7 \times 10^{-10}$
L-204	7.4	$< 8.5 \times 10^{-8}$	$< 1.1 \times 10^{-9}$	$< 8.1 \times 10^{-10}$
プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13635	64.8	0.1	4.3×10^{-7}	$< 8.5 \times 10^{-10}$
L-312	5.8	$< 7.4 \times 10^{-8}$	$< 8.4 \times 10^{-9}$	$< 8.3 \times 10^{-10}$

■ 時間は菌液と後の経過時間。

0-2.5 は 0 時 (投与時) より 2.5 時間の間の合計の回収中の菌数。

■ 2.5 時間は 2.5 時間後に放したラットの腸内の菌数。

さらに本発明のリゾチーム感受性菌株の種々薬剤に対する性質を調べたところ、種々の抗生物質に感受性になっていることを見出した。

実施例 1 リゾチーム超感受性菌株の製造

コリネバクテリウム・グルタミカム 225-106、コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868、プレバクテリウム・ダイバリカツム ATCC 14021 およびプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13635 を M_B 培地 (粉末ブイヨン 20g、酵母エキス 5g を純水 1ℓ に含み、pH 7.2 に調整した培地) に接種し、30℃ で 48 時間培養する。対数増殖期半ばで培養を中止して菌液を生理的食塩水で洗浄後、M/20 トリス・マレート緩衝液 (pH 6.0) に約 5×10^6 細胞/ℓ となるように懸濁する。

この懸濁液に最終濃度 400 μg/ℓ になるようにニトログアニシンを加え、25℃ で 30 分間放置する。遠心分離により菌液を分離し、同一緩衝液で菌体を洗浄後、生理的食塩水に懸濁し、生理的食塩水で適量希釈して一定量を M_B 寒天培地と 125 μg/ℓ のリゾチーム含有寒天培地とに塗りつける。

すなわち、対数増殖期の約 10^6 細胞相菌を種々系列の濃度の薬剤を含む M_B 寒天培地に接種し、30℃ で 2 日間培養後、菌の生育状態を観察することにより本発明微生物の感受性を調べた結果、図 3 に示すごとく、ペニシリン G、リファンピシリンなどに極めて感受性であることがわかった。このことは、種々の薬剤で菌株より殺菌、静置しやすいことを示唆しており、組換え DNA のベクターとして薬剤耐性プラスミドを用いる場合の薬剤抵抗性の増大を緩和する効用もあることを示している。

第 3 表

	薬剤感受性 (MIC, μg/ℓ)		
	リゾチーム	ペニシリン G	リファンピシリン
コリネバクテリウム・グルタミカム 225-106	800	0.12	0.016
L-15	22	0.015	0.004

■ MIC: 最低生育阻止濃度

以上のごとく、本発明のリゾチーム感受性微生物が、動物の消化管内で著しく死滅しやすく、さらに種々の薬剤に対して感受性になっていることは、試験微生物が組換え DNA 宿主微生物として好ましい性質を有することを示している。

30℃ で 2 日間培養し、生じたコロニーを寒天培地と 125 μg/ℓ のリゾチームを含有する M_B 寒天培地にレプリカ転写する。レプリカ平板を 30℃ で 2 日間培養後、M_B 寒天培地で生育させ、リゾチーム含有寒天培地で生育しない菌をリゾチーム超感受性菌株として取得する。

第 3 表

株	リゾチーム感受性菌株
コリネバクテリウム・グルタミカム 225-106	コリネバクテリウム・グルタミカム L-15
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868	コリネバクテリウム・ハーキュリス L-103
プレバクテリウム・ダイバリカツム ATCC 14021	プレバクテリウム・ダイバリカツム L-204
プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13635	プレバクテリウム・ラクトファーメンタム L-312

実施例 2

本発明微生物のリゾチームによる細胞膜溶解作用と主成分プロトプラストの再生

コリネバクテリウム・グルタミカム 225-106、コリネバクテリウム・ハーキユリス AT00/3868、プレビバクテリウム・アイバリカナム AT00/4030、プレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATQ0/3633 および、それらから誘導され実施例1で得られたリゾチーム超感受性菌株の培養を、M B 培地に接種し、30℃で振盪培養する。東京光電比色計で660nmにおける吸光度(OD)を測定し、OD 0.6 になった時点で、生理的食塩水で適量に希釈して一定量を M B 肺炎培地に散布し、初発の正常細胞数を測定すると同時に、培養液から細胞を集菌し、該細胞を R O O 2 培地(10/100)のリゾチームを含む液(PH 7.6)に約10細胞/100となる様に懸濁し、L 型試験管に懸濁して30℃でゆるやかに加温反比する。

5時間後細胞を2500×gで10分間遠心分離して回収し、前記P F M 培地に懸濁して2回遠心洗浄後、等容量のP F M 培地に再懸濁してプロトプラスト菌液を調製した。この一部を

いずれの菌株も、リゾチームを作用させても細胞内で棍棒状の正常細胞しかみられず、外状のプロトプラストの生成は観察されない。また低張条件でのコロニー形成数もリゾチーム処置前とほとんど変わらなかった。一方、リゾチーム超感受性菌株は、リゾチームの細胞溶解作用によりプロトプラスト化され、プロトプラストの破綻死する低張条件で生育可能な残存菌数(浸透圧ショック抵抗性の非プロトプラスト細胞と考えられる)は、リゾチーム処置供試菌数あたり 10^{-5} ~ 10^{-6} であつた。これらのプロトプラストは、高張条件ではコロニー形成能を有し、その再生効率はリゾチーム処置供試菌数に対して20~70%であつた。一旦再生したコロニーは M B 肺炎培地上で生育できる正常細胞であつた。

実施例2

本発明微生物から得られるプロトプラストのプラスミド P O O 4 は M B K による形質転換1) プラスミド P O O 4 の分離

とり、一つは H O O P 培地で適量に希釈して一定量を H O O P 肺炎培地に散布接種し、もう一つは生理的食塩水で適量に希釈して M B 肺炎培地に散布接種し30℃で培養して、各々高張条件、低張条件でのコロニー形成可能菌数(cfu/ml)を求めた。低張条件での生成コロニー数は、培養3日目に測定した(さらに培養しても数は増加しない)。高張条件での生成コロニー数は、それ以上培養しても再生コロニーが増加しない7日目に測定した。これらの結果を第3表に示す。

第 3 表

菌 株	リゾチーム処置供試菌数 (cfu/ml)	リゾチーム処置後コロニー形成可能菌数 (cfu/ml)	
		低張条件	高張条件
コリネバクテリウム・グルタミカム L13	1.8×10^5	2.5×10^5	6.7×10^5
コリネバクテリウム・グルタミカム 225-106	2.3×10^5	2.1×10^5	2.3×10^5
コリネバクテリウム・ハーキユリス L103	1.2×10^5	6.3×10^5	2.4×10^5
コリネバクテリウム・ハーキユリス AT00/3868	1.3×10^5	1.3×10^5	1.4×10^5
プレビバクテリウム・アイバリカナム L204	2.6×10^5	1.1×10^5	6.4×10^5
プレビバクテリウム・アイバリカナム AT00/4030	1.2×10^5	1.3×10^5	1.4×10^5
プレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム L312	1.0×10^5	1.4×10^5	2.3×10^5
プレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム AT00/3633	1.1×10^5	2.9×10^5	1.0×10^5

本実施例において形質転換に使用するプラスミド P O O 4 は、P O O 4 の保有菌であるコリネバクテリウム・グルタミカム 225-250 (彼工研寄託受遺書第3939号)の培養菌体から次のように抽出分離した。コリネバクテリウム・グルタミカム 225-250 を M B 培地で培養した培養液5mlを、400ml 半合成培地 B B M に接種して30℃で振盪培養する。東京光電比色計で660nmにおける吸光度(OD)を測定し、OD 0.2 になった時点で、培養液中0.5単位/mlの濃度になるようにペニシリンGを加える。さらに30℃で培養を継続し、OD 約0.6 になるまで生育させる。

培養液から菌体を集菌し、T B B 緩衝液[0.05M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス)、0.005M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(B D T A) 0.05M NaCl : pH 8.0]で洗浄後、リゾチーム液(2.5%シロネ、0.1M NaCl、0.05M

トリス、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ リゾチーム、 $\text{pH} 8.0$) で 10 ml に懸濁し、 37°C で 4 時間反応させる。反応液は、 $5 \text{ M NaOH } 2.4 \text{ ml}$ 、 $0.5 \text{ M EDTA (pH 8.5) } 0.6 \text{ ml}$ 、 4 多ラウリン硫酸ナトリウムと 0.7 M NaOH からなる溶液 4.4 ml を順次添加し、緩やかに混和してから氷水中に 1.5 時間置く。精製物全量を遠心管に移し、 4°C で 60 分間、 $6.8 \times 10^5 \times 8$ の遠心分離にかけ上澄液をとる。これに重量百分率 10 多相当の $\text{P} 80 \text{ G } 6000$ を加え、ゆかに混和して溶解後氷水中に置く。 1.6 時間後、 1.500×8 で 10 分間遠心分離してペレットを回収する。 $\text{T} 8 \text{ B}$ 緩衝液 5 ml を加えて、ペレットをゆかに再溶解してから 1.5 ml のエタジウムブロマイド 5 ml を添加し、これに塩化セシウムを加えてゆかに溶解し、密度を 1.580 に合わせる。この溶液を 10.5000×8 、 1.8°C で 4.8 時間遠心分離する。この密度勾配遠心により、共有結合で閉じられた環状 DNA は、紫外線ランプを照射すること

によつて遠心チューブ中下方の密度の高いバンドとして見出される。このバンドを注射器で遠心チューブの側面から抜きとることによつて、プラスミド $\text{p} 00 \Phi$ が分離される。次いで分画液を特容量のイソプロピルアルコール液〔容量百分率 90 多イソプロピルアルコール、 10 多 $\text{T} 8 \text{ B}$ 緩衝液 (この緩液中に飽和溶解量の塩化セシウムを含む)〕で 2 回処理してエタジウムブロマイドを抽出除去し、しかる後に、 $\text{T} 8 \text{ B}$ 緩衝液に対して透析する。このようにして $1.5 \mu\text{g}$ のプラスミド $\text{p} 00 \Phi$ が得られる。

プラスミド $\text{p} 00 \Phi$ は約 1.9 Md の分子重を有し、ストレプトマイシンおよびまたはスペクノマイシンに耐性を示す遺伝子を有し、かつ分子中に NcoI ^{Bam HI} _{Hind III}、 Pst I および Hae I による切断部位をそれぞれ 4 、 6 、 9 、 6 および 6 個有している新規プラスミドである。

2) プラスミド $\text{p} 00 \Phi$ の形質転換

形質転換は、実施例 1 と同様に調製したリゾチーム処理細胞を用いて行つた。プロトプラスト溶液 0.5 ml を小試験管にとり、 2.500×8 で 5 分間遠心分離し、 $\text{T} 8 \text{ B}$ 緩衝液〔 100 mM 塩化マグネシウム、 300 mM 塩化カルシウム、 500 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、 400 mM シロリン酸、 $\text{pH} 7.5$ 〕 7 ml に再懸濁して遠心沈降する。沈降したプロトプラストに 0.1 ml の $\text{T} 8 \text{ B}$ 緩衝液を加え、ゆるやかに揺つて再懸濁する。これに上記の 2 倍高濃度の $\text{T} 8 \text{ B}$ 緩衝液と 1 対 1 に混合した $\text{p} 00 \Phi$ DNA 液 0.1 ml ($0.2 \text{ } \mu\text{g}$ DNA 含有) を加えて混和し、次いで $\text{T} 8 \text{ B}$ 緩衝液中に 20 多 $\text{P} 80 \text{ G } 6000$ を含む液 0.8 ml を添加してゆるやかに混和する。 5 分後、 $\text{R} 00 \text{ P}$ 増地 5 ml を添加し、 1.500×8 で 5 分間遠心分離にかけて上澄液を除去し、沈降したプロトプラストを 1 ml の $\text{R} 00 \text{ P}$ 増地に懸濁してから $\text{R} 00 \text{ P}$ 増地で数分間培養

し、一定量をスペクノマイシン $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む $\text{R} 00 \text{ P}$ 増地増地に塗布する。

同時にコロニー形成可能菌数を知るために、 $\text{R} 00 \text{ P}$ 増地増地にも高希釈度の液を一定量塗布する。 30°C で 6 日間培養して出現したコロニー数を測定する。

スペクノマイシン含有 $\text{R} 00 \text{ P}$ 増地で生じたコロニーをとり、 $1.5 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを含む $\text{M} 8$ 増地増地に塗布し、 30°C で 2 日間培養してストレプトマイシン耐性形質の同時転移を調べた。交差耐性を示した株を無作為に選り、実施例 4 に示す方法でプラスミドを単離した。

これらの結果を別表にまとめて示した。

表 3 続

受 容 体	スペクトノマイシン 耐性菌出現の概 率	スペクトノマイシン耐性菌の性質	
		ストレプトマイシン 交差耐性	DOC#の保有
コリネバクテリウム・グルタミカム J28-106	1.7×10^{-7}	-(3/3)	-(2/2)
コリネバクテリウム・グルタミカム L13	2.6×10^{-8}	+(30/30)	+(2/2)
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 35668	$< 1.3 \times 10^{-7}$		
コリネバクテリウム・ハーキュリス L103	2.3×10^{-6}	+(30/30)	+(2/2)
プレバクテリウム・テイバリカツム ATCC 35030	2.3×10^{-7}	-(3/3)	-(2/2)
プレバクテリウム・テイバリカツム L304	1.0×10^{-6}	+(30/30)	+(2/2)
フレキシバクテリウム・ラクトフーメンタム ATCC 35653	2.1×10^{-7}	-(3/3)	-(2/2)
フレキシバクテリウム・ラクトフーメンタム L312	2.6×10^{-8}	+(30/30)	+(2/2)

※ 高濃度でのコロニー形成可細胞（内生菌）
ありの程度。

※ 括弧内は試験菌株。

※ この菌株ではスペクトノマイシン耐性菌は
得られなかった。

実施例 6

プラスミドを保有する微生物からのプラスミ ドの単離

実施例 5 で取得した DOC# の形質転換株で
あるコリネバクテリウム・グルタミカム L13/
DOC#、コリネバクテリウム・ハーキュリス
L103/DOC#、プレバクテリウム・テ
イバリカツム L304/DOC# およびプレバ
クテリウム・ラクトフーメンタム L312/
DOC# を M8 培地で培養した培養液を
400 ml M8 培地に接種し、30℃で 12 時間
無菌培養する。

培養液から菌体を集菌し、TEB 緩衝液で洗
浄後、リゾチーム液（25 mg/ml、0.1 M NaCl、
0.05 M トリス、0.05 M リゾチーム：pH
8）/0.1 M に懸濁し、37℃で 1 時間反応さ
せる。反応液に 5 M NaOH 2.4 ml、0.5 M EDTA
（pH 8.5）0.6 ml、4% ラウリル硫酸ナトリ
ウムと 0.7 M NaOH からなる溶液 4 ml を順次添
加し、緩やかに混和してから水水中に 15 時間

リゾチーム非感受性の菌株をリゾチーム処
理した細胞で出現したスペクトノマイシン耐
性株は、ストレプトマイシン交差耐性を示さ
ず、さらに前記の J28-106 株と同様に
プラスミドを単離したが、DOC# の存在は
認められなかった。一方、リゾチーム超感受
性菌株をリゾチーム処理した細胞で出現した
スペクトノマイシン耐性株はストレプトマイ
シン交差耐性を有し、それらの株から分離さ
れるプラスミドは、制限酵素 Hind III で消化
後、アガロース電気泳動にかけてわかる生成
DNA 断片が DOC# と同一であった。

上記のようにして得られた DOC# の形質
転換株の改工研究所受渡番号を第 3 表に示す。

表 3 続

受 容 体	DOC# 形質転換株	改工研究所受渡番号
コリネバクテリウム・グルタミカム L13	L13/DOC#	5946
コリネバクテリウム・ハーキュリス L103	L103/DOC#	5947
プレバクテリウム・テイバリカツム L304	L304/DOC#	5948
フレキシバクテリウム・ラクトフーメンタム L312	L312/DOC#	5949

置く。溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で 60
分間、48000×g の遠心分離にかけ上澄液
をとる。これに重量百分率 10% 相当の PEG
6000 を加え、十分に混和して溶解後水水中
に置く。16 時間後、13000×g で 10 分間
遠心してペレットを回収する。TEB 緩衝液 5
ml を加えてペレットを再溶解してから 1.5 ml/
ml エタジウムブロマイド 3 ml を添加する。これ
に塩化セシウムを加えて溶解し、密度を 1.580
に合わせる。この溶液を実施例 5 に記載したの
と同一条件で密度勾配遠心にかけ、プラスミド
を分離採取する。分離液を実施例 5 と同様イ
ソプロピルアルコール液処置によりエタジウム
ブロマイドを抽出除去した後、TEB 緩衝液に
対して遠析する。

このようにして DOC# を保有するいずれの
リゾチーム超感受性株からも 15~50 MB の
DOC# DNA が得られた。

特許出願人 (102) 協和薬業工業株式会社

代表者 木 下 祝 郎



昭和57年6月16日

第1頁の続き

②発明者 岡徹夫

横浜市緑区奈良町2360-17

②発明者 古屋晃

川崎市多摩区多摩美1-10-5

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和56年特許願第15146号

2. 発明の名称

新規リゾチーム感受性微生物

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和薬工株式会社
(TEL:03-201-7211 内線2751)

代表者 木下 祝郎

4. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄および発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

- (2) 明細書第12頁3行～5行目の「栄養寒天培地----含む培地)」を「完全培地たとは富栄養培地(NB)に寒天1.8%を加えた培地」に訂正する。
- (3) 明細書第12頁7行目および同第13頁6行目の「2.5～2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 」を「2.5～2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 」に訂正する。
- (4) 明細書第23頁下から6行目の「菌数」を「菌の回収率」に訂正する。
- (5) 明細書第23頁下から8～4行目の「放したラットの腸内の菌数」を「切除したマウスの腸内の菌の回収率」に訂正する。
- (6) 明細書第25頁19行目の「と125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチーム含有寒天培地と」を削除する。
- (7) 明細書第26頁2行目の「リゾチーム」を「卵白リゾチーム(生化学工業社製、6回再結物)」に訂正する。
- (8) 明細書第26頁5行目の「生育させ、」を「生育し、」に訂正する。
- (9) 明細書第26頁8行目の「第2表」を「第

- 4表」に訂正する。
- (10) 明細書第27頁18行目の「約10⁸細胞」を「約10⁸細胞」に訂正する。
- (11) 明細書第28頁10行目および11行目の「第3表」を「第5表」に訂正する。
- (12) 明細書第31頁3行目の「反応液は、」を「反応液に、」に訂正する。
- (13) 明細書第32頁下から2行目の「4、6、9、8」を「4、7、9、8」に訂正する。
- (14) 明細書第34頁1.4行目および同第35頁1行目の「第4表」を「第6表」に訂正する。
- (15) 明細書第36頁1.4行および1.5行目の「第5表」を「第7表」に訂正する。
- (16) 明細書第38頁の1.4行目および表中の「微生物研寄託受渡番号」を「微生物研寄託」に、同表中「5946、5947、5948 および5949」をそれぞれ「5950、5951、5952 および5953」に訂正する。
- (17) 明細書第38頁2.3.4.9.12および14～15行目、第14頁の第1表中、および第30頁

4行目の「微工研寄託受理番号」を「微工研
寄託」に訂正する。

6.添付書類の目録

微生物受託番号通知書 各 1通

特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示す新規リゾチーム感受性微生物。
- (2) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・ハーキュリス、プレビバクテリウム・ディパリカツムおよびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムから選ばれる微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の微生物。
- (3) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクムL-15(微工研寄託5946, ATCC31834)、コリネバクテリウム・ハーキュリスL-108(微工研寄託5947, ATCC31866)、プレビバクテリウム・ディパリカツムL-204(微工研寄託5948, ATCC31867)およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムL-312(微工研寄託5949, ATCC31868)から選ばれる微生物であることを特徴とする特

許請求の範囲第1項記載の微生物。

- (4) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、該微生物のプロトプラストを生成せしめることを特徴とするコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物のプロトプラストの調製法。
- (5) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示すリゾチーム感受性微生物にリゾチームを作用させ、得られるプロトプラストにデオキシリボ核酸を取り込ませ、ついで該プロトプラストを再生させることを特徴とするコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物の形質転換法。
- (6) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示す微生物を組換えDNA技術の宿主微生物として用いる方法。

- (7) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の濃度のリゾチームに感受性を示し、プラスミドpC04を担う新規リゾチーム感受性微生物。
- (8) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・ハーキュリス、プレビバクテリウム・ディパリカツムおよびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムから選ばれる特許請求の範囲第7項記載の微生物。
- (9) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミクムL15/pC04(微工研寄託5950)、コリネバクテリウム・ハーキュリスL108/pC04(微工研寄託5951)、プレビバクテリウム・ディパリカツムL204/pC04(微工研寄託5952)およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムL312/pC04(微工研寄託5953)から選ばれる特許請求の範囲第8項記載の微生物。